

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11147833 A**

(43) Date of publication of application: **02.06.99**

(51) Int. Cl

A61K 35/78

A61K 35/78

A61K 35/78

A61K 35/78

A61K 35/78

A61K 35/78

A61K 35/78

(21) Application number: **09334981**

(22) Date of filing: **18.11.97**

(71) Applicant: **NOEVIR CO LTD**

(72) Inventor: **OBAYASHI MEGUMI
OKANO YURI
MASAKI HITOSHI**

(54) **COLLAGENASE INHIBITOR**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a collagenase inhibitor capable of specifically inhibiting interstitial collagenase produced by a mesenchymal cell such as fibroblast, etc., an eosinophils, etc., effective for improving and preventing morbid states related to collagenase, such as inflammation, wound, metastasis of cancer, ulceration, aging of skin, etc.

SOLUTION: This inhibitor contains one or more extracts of Eucalyptus globulus Labillardiere, its allied species such as E.polybractea R.T.Baker or E dives Schauer, Salvia officinalis L., its variety such as S.officinalis var.tenuior, Houttuynia cordata Thunb, Paeonia suffruticosa Andrews (P.moutan Sims), Paeonia lactiflora Pallas (P.albiflora Pail.), P.japonica Miyabe et Takeda, P. obovata Maxim. and P. veitchii Lynch.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-147833

(43) 公開日 平成11年(1999) 6月2日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K 35/78	A E D	A 6 1 K 35/78	A E D F
	A B E		A B E Q
	A C L		A C L
	A D A		A D A
	A D T		A D T C
審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-334981	(71) 出願人	000135324 株式会社ノエビア 兵庫県神戸市中央区港島中町6丁目13番地の1
(22) 出願日	平成9年(1997)11月18日	(72) 発明者	大林 恵 滋賀県八日市市岡田町字野上112-1 株式会社ノエビア基礎研究所内
		(72) 発明者	岡野 由利 滋賀県八日市市岡田町字野上112-1 株式会社ノエビア基礎研究所内
		(72) 発明者	正木 仁 滋賀県八日市市岡田町字野上112-1 株式会社ノエビア基礎研究所内
		(74) 代理人	竹井 増美

(54) 【発明の名称】 コラゲナーゼ阻害剤

(57) 【要約】

【課題】 線維芽細胞等の間葉系細胞や好酸球等により産生される間質系のコラゲナーゼを特異的に阻害し、炎症や創傷、がんの転移、潰瘍形成、皮膚の老化等、コラゲナーゼの関与する病態の改善、防止に有効なコラゲナーゼ阻害剤を得る。

【解決手段】 ユーカリノキ (*Eucalyptus globulus* La billardiere)、その近縁植物 (*E. polybractea* R.T.Baker, *E. dives* Schauer)、サルビア (*Salvia officinalis* L.)、その変種 (*S. officinalis* var. *tenuior*)、ドクダミ (*Houttuynia cordata* Thunb.)、ボタン (*Paeonia suffruticosa* Andrews (*P. moutan* Sims))、シャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pallas (*P. albiflora* Pal l.))、ヤマシャクヤク (*P. japonica* Miyabe et Taked a)、ベニバナヤマシャクヤク (*P. obovata* Maxim.)、センセキシヤク (*P. veitchii* Lynch.) の抽出物の1種又は2種以上を含有させる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ユーカリノキ (*Eucalyptus globulus* Labillardiere), その近縁植物 (*E. polybractea* R.T.Baker, *E. dives* Schauer), サルビア (*Salvia officinalis* L.), その変種 (*S. officinalis* var. *tenuior*), ドクダミ (*Houttuynia cordata* Thunb.), ボタン (*Paeonia suffruticosa* Andrews (*P. moutan* Sims)), シャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pallas (*P. albiflora* Pall.)), ヤマシャクヤク (*P. japonica* Miyabe et Takeda), ベニバナヤマシャクヤク (*P. obovata* Maxim.), センセキシャク (*P. veitchii* Lynch.) の抽出物の 1 種又は 2 種以上を含有して成る、コラゲナーゼ阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、主として間葉系細胞により産生される間質系のコラゲナーゼに対し、特異的に作用するコラゲナーゼ阻害剤に関する。さらに詳しくは、ユーカリノキ等特定の植物の抽出物の 1 種又は 2 種以上を含有して成るコラゲナーゼ阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、マトリックス線維の分解を促進するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が種々の病態に関与していることが明らかになってきた。MMP の中でも、線維芽細胞等の間葉系細胞や、炎症部位に存在する好酸球等により産生される間質系のコラゲナーゼが、がん細胞の転移や潰瘍形成、歯周炎や歯形成等に関与することが報告されている。また前記コラゲナーゼは、皮膚真皮のコラーゲン線維を分解して皮膚弾性の低下やしわの発生にも関与している。これらコラゲナーゼの産生が、紫外線やアレルギー等の外部刺激により誘導されるサイトカインによって促進されることも知られている。

【0003】 それゆえ、前記のようなコラゲナーゼの活性を阻害するコラゲナーゼ阻害剤のスクリーニングも盛んに行われてきた。たとえば、アシルフェニルグリシン誘導体 (特開平 7-101925)、ザクロ実、レモンバーム実及び葉、グアバ、ハマメリスといった植物の抽出物 (特開平 7-196526, 同 7-291873, 同 8-283133)、ポリボレン酸及びこれを含有するハウロクタケ抽出物 (特開平 9-40552)、ジカルボン酸 (特開平 9-124472)、アスペルギルス属微生物の産生物質 (特開平 9-241287) などが開示されている。

【0004】 しかしながら、これまでに得られたコラゲナーゼ阻害剤の中には、細菌性のコラゲナーゼに対し強い阻害活性を示し、間質系のコラゲナーゼに対する特異性の低いものや、阻害活性が十分でないもの、安定性に欠けるものも存在していた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 そこで本発明において

は、線維芽細胞等の間葉系細胞や好酸球等により産生される間質系のコラゲナーゼに対し特異的に阻害活性を示し、炎症や創傷、がんの転移、潰瘍形成、皮膚の老化等、コラゲナーゼの関与する病態を改善し、或いは防止し得るコラゲナーゼ阻害剤を得ることを目的とした。

【0006】

【課題を解決するための手段】 上記の課題を解決するため、本発明者らは安定性及び安全性が高く、しかも高活性のコラゲナーゼ阻害剤のスクリーニングを行った。その結果、ユーカリノキ、サルビア、ドクダミ、ボタン及びシャクヤク又はこれらの近縁植物の抽出物に優れたコラゲナーゼ阻害活性を見だし、これを含有させることによって、コラゲナーゼの関与する病態を良好に改善し得るコラゲナーゼ阻害剤を得ることができた。

【0007】 すなわち本発明においては、ユーカリノキ

(*Eucalyptus globulus* Labillardiere), その近縁植物 (*E. polybractea* R.T.Baker, *E. dives* Schauer), サルビア (*Salvia officinalis* L.), その変種 (*S. officinalis* var. *tenuior*), ドクダミ (*Houttuynia cordata* Thunb.), ボタン (*Paeonia suffruticosa* Andrews (*P. moutan* Sims)), シャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pallas (*P. albiflora* Pall.)), ヤマシャクヤク (*P. japonica* Miyabe et Takeda), ベニバナヤマシャクヤク (*P. obovata* Maxim.), センセキシャク (*P. veitchii* Lynch.) の抽出物の 1 種又は 2 種以上を基剤に含有させる。

【0008】 なお上記植物の抽出物は、従来より化粧料や皮膚外用剤に配合されており、ユーカリノキ抽出物については *Porphyromonas gingivalis* により産生されたコラゲナーゼを抑制する作用 (特開平 8-109118)、サルビア抽出物については抗酸化作用 (特公平 5-3454) 等、ドクダミ抽出物については活性酸素消去作用や抗炎症、抗そう痒作用等 (特開平 9-143025)、ボタン、シャクヤクの各抽出物については保湿作用 (特開平 9-30927, 特開平 8-325116)、ヒドロキシラジカル消去作用 (特開平 9-20633)、がん転移抑制作用 (特開平 7-258104)、動脈硬化防止作用 (特開平 7-238025)、スーパーオキシド消去作用 (特開平 4-5237)、がんの治療効果 (特開平 3-127736)、ヒアルロニダーゼ阻害作用 (特開平 1-128933)、*Staphylococcus* 属細菌由来のプロテアーゼに対する阻害作用 (特開平 1-128934) などが開示されているが、これら植物抽出物の間質系コラゲナーゼに対する特異的な阻害作用についてはいまだに報告されていない。

【0009】

【発明の実施の形態】 本発明のコラゲナーゼ阻害剤に含有させる抽出物を得るために用いるユーカリノキ (*Eucalyptus globulus* Labillardiere) は、ユーカリ油の基原植物として用いられるオーストラリア原産のフトモモ

科に属する常緑高木である。その近縁植物 (*E. polybractea* R.T.Baker, *E. dives* Schauer) も用いることができる。次にサルビア (*Salvia officinalis* L.) はヨーロッパ原産のシソ科に属する多年草で、セージとも称される。その変種 (*S. officinalis* var. *tenuior*) も同様に用いることができる。ドクダミ (*Houttuynia cordata* Thunb.) はジウヤクの基原植物で、日本各地の陰湿地に自生するドクダミ科の多年草である。ボタン (*Paeonia suffruticosa* Andrews 又は *P. moutan* Sims) はボタンピの基原植物で、中国原産のボタン科に属する落葉低木である。またシャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pallas 又は *P. albiflora* Pall.) は生薬シャクヤクの基原植物であり、東アジア原産のボタン科に属する多年草である。近縁植物であるヤマシャクヤク (*P. japonica* Miyabe et Takeda)、ベニバナヤマシャクヤク (*P. obovata* Maxim.)、センセキシヤク (*P. veitchii* Lynch.) も同様に用いることができる。抽出には、前記植物の花、茎、葉、根の各部位及び全草又は全木を用いることができる。本発明においては、これら抽出物より1種又は2種以上を選択して用いる。

【0010】上記植物は生のまま抽出操作に供しても良いが、抽出効率を考えると、細切、乾燥、粉碎等の処理を行った後抽出を行うことが好ましい。抽出は、抽出溶媒に浸漬して行う。抽出効率を上げるため攪拌を行ったり、抽出溶媒中でホモジナイズすることもできる。抽出温度としては5℃～50℃程度が適切である。抽出時間は、4時間～10日間程度である。

【0011】抽出溶媒としては、水その他、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール等の低級アルコール、1,3-ブチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、グリセリン等の多価アルコール、エチルエーテル、プロピルエーテル等のエーテル類、酢酸エチル、酢酸ブチル等のエステル類、アセトン、エチルメチルケトン等のケトン類などの極性有機溶媒を用いることができ、これらより1種又は2種以上を選択して用いる。また、生理食塩水、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水等を用いても良い。

【0012】上記ユーカリノキ等の植物抽出物は、そのままでもコラゲナーゼ阻害剤基剤に添加できるが、濃縮、乾固したものを水や極性溶媒に再度溶解したり、或いはコラゲナーゼ阻害作用を損なわない範囲で脱色、脱臭、脱塩等の精製処理を行った後に添加しても良い。また保存のためには、精製処理の後凍結乾燥し、用時に溶媒に溶解させて用いることが好ましい。コラゲナーゼ阻害剤への配合量は、上記植物の乾燥粉末を十分浸漬し得る量の溶媒にて抽出し、抽出物を減圧乾固して得た固形分を再度溶媒に溶解した状態で、0.001～1.0容量%程度とするのが適当である。

【0013】さらに本発明に係るコラゲナーゼ阻害剤には、活性酸素消去剤、抗炎症剤、抗がん剤、美白剤、皮

膚細胞賦活剤、殺菌剤の他、油類、界面活性剤、保湿剤、紫外線吸収剤、粉体、香料、防腐剤等、一般的な医薬品及び化粧品原料をも含有させることができる。

【0014】本発明に係るコラゲナーゼ阻害剤は、液状、ゲル状、クリーム状、ペースト状又は粉末状の形態で、ローション剤、乳剤、ゲル剤、クリーム剤、軟膏等の剤型で提供することができる。

【0015】

【実施例】さらに本発明の特徴について、実施例により詳細に説明する。

【0016】【実施例1～実施例4】ユーカリノキ (*Eucalyptus globulus* Labillardiere) の葉、サルビア (*Salvia officinalis* L.) の葉、ドクダミ (*Houttuynia cordata* Thunb.) の花期の地上部、及びシャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pallas) の根の各乾燥粉末500gを、50容量%エタノール水溶液1,000mlに浸漬し、室温にて7日間静置した。その後植物粉末をろ別除去し、溶媒を減圧留去して得られた固形分を50容量%エタノール水溶液50mlにて再溶解し、それぞれ実施例1～実施例4とした。

【0017】【実施例5】ユーカリノキ (*Eucalyptus globulus* Labillardiere) の葉500gを、0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 1,000ml中に浸漬してホモジナイズし、室温にて一晚抽出する。抽出液をセファデックスG-15カラムクロマトグラフィーにより脱塩した後凍結乾燥した。この凍結乾燥粉末を、10.0(w/v)%となるように前記リン酸緩衝液に溶解し、実施例5とした。

【0018】【実施例6】サルビアの変種 (*Salvia officinalis* var. *tenuior*) の全草500gを、50.0容量%エタノール水溶液1,000ml中に浸漬してホモジナイズし、室温にて一晚抽出する。抽出液を減圧濃縮して溶媒を除去し、乾固物を50.0容量%1,3-ブチレングリコール水溶液50mlに再度溶解し、活性炭処理して実施例6とした。

【0019】【実施例7】ボタン (*Paeonia suffruticosa* Andrews (*P. moutan* Sims)) の根500gを細切し、20容量%グリセリン1,000ml中に攪拌しながら5日間20℃で浸漬した。抽出液をろ別し、活性炭処理した後100mlまで濃縮して実施例7とした。

【0020】【実施例8】ドクダミ (*Houttuynia cordata* Thunb.) の全草、ベニバナヤマシャクヤク (*P. obovata* Maxim.) 及びセンセキシヤク (*P. veitchii* Lynch.) の全木各500gを乾燥粉碎し、それぞれ精製水500ml中に浸漬して攪拌し、50℃にて6時間抽出した。各抽出液をセファデックスG-15カラムクロマトグラフィーにより脱塩した後100mlまで濃縮し、等容量ずつ混合して実施例8とした。

【0021】上記の各実施例について、I型コラゲナーゼ標品を用いてコラゲナーゼに対する阻害作用を評価し

た。コラゲナーゼ活性は、I型コラゲナーゼ標品を0.25mg/mlのフルオレセインイソチオシアネート(FITC)で標識したI型コラーゲンと35℃で2時間インキュベートし、反応液を35℃で30分間処理した後、エタノール沈殿法により分解されたコラーゲン含有上清を得、この上清中に含有されるコラーゲンの蛍光強度を蛍光分光光度計により、励起波長490nm、蛍*

$$\text{コラゲナーゼ阻害率(\%)} = \frac{(\text{試料未添加時の蛍光強度}) - (\text{試料添加時の蛍光強度})}{(\text{試料未添加時の蛍光強度})} \times 100$$

【0022】

【表1】

試料	コラゲナーゼ阻害率(%)
実施例1	94.9
実施例2	70.0
実施例3	31.9
実施例4	58.0
実施例5	80.1
実施例6	68.4
実施例7	47.5
実施例8	35.6

表1より明らかなように、本発明の各実施例はいずれも危険率1%で、I型コラゲナーゼ標品に対し、有意なコラゲナーゼ阻害作用を示していた。特に、実施例1、実施例2、実施例4～実施例6では、58.0%以上の高いコラゲナーゼ活性阻害率を示していた。

【0023】次に本発明の実施例1について、0.02mg/ml～0.1mg/mlの濃度範囲で、精製I型コラゲナーゼ及びヒト線維芽細胞由来コラゲナーゼに対※

実施例1の添加濃度 (mg/ml)	コラゲナーゼ阻害率(%)	
	精製I型コラゲナーゼ	線維芽細胞由来コラゲナーゼ
0.02	28.0	
0.025		14.7
0.05		69.7
0.1	70.3	96.3

【0024】続いて、本発明の各実施例について熱及び光に対する安定性を評価した。各実施例を100℃で10分間熱処理した場合、及び3カ月間露光保存した場合のそれぞれについて、0.1mg/ml添加時のコラゲナーゼ阻害率を測定し、未処理の場合のコラゲナーゼ阻害率と比較して表3に示した。コラゲナーゼとしては、I型コラゲナーゼ標品を用いた。表3より明らかなように、いずれの実施例も熱及び光に対し非常に良好な安定性を示し、100℃で10分間の熱処理を行った場合には83%以上、3カ月間の露光保存を行った場合には92%以上のコラゲナーゼ阻害活性を保持していた。

【表3】

*光波長520nmで測定して求めた。本発明に係る実施例のコラゲナーゼ阻害作用は、各実施例0.1mg/mlの存在下に前記I型コラゲナーゼ標品を前記標識コラーゲンと作用させて酵素活性を測定し、(1)式によりコラゲナーゼ阻害率を算出して表した。結果は表1に示した。

【数1】

※する阻害作用を評価した。精製I型コラゲナーゼは、0.25ユニット/mlの濃度で用いた。またヒト線維芽細胞由来コラゲナーゼとしては、ヒト線維芽細胞を、1ウェル当たり 5×10^4 個となるように48穴マイクロプレートに播種し、24時間後にインターロイキン-1 α (IL-1 α)及び表皮成長因子(EGF)各10ng/mlを添加したダルベッコ修正基礎栄養培地(DMEM)に交換し、さらに37℃で48時間培養した後、培地を採取し、採取した培地にトリプシンを0.04mg/mlとなるように添加して、37℃で30分間反応させ、上清中のコラゲナーゼを活性化したものを用いた。コラゲナーゼ活性及びその阻害率は、前記と同様にして求めた。その結果、表2に示すように、実施例1は前記濃度範囲で濃度依存的に、精製I型及び線維芽細胞由来コラゲナーゼを阻害することが示された。

【表2】

試料	コラゲナーゼ阻害率(%)		
	100℃10分間熱処理	3カ月間露光保存	未処理
実施例1	85.6	90.3	94.1
実施例2	62.9	67.9	71.5
実施例3	26.5	29.0	30.8
実施例4	49.8	55.1	58.6
実施例5	65.9	75.4	78.5
実施例6	58.5	68.2	69.6
実施例7	39.2	44.4	47.2
実施例8	32.5	34.4	37.4

【0025】また、本発明の各実施例について、培養ヒト線維芽細胞に対する細胞毒性を評価した。ヒト由来線維芽細胞を、1ウェル当たり 2.0×10^4 個となるように96穴マイクロプレートに播種し、24時間後に、実施例のそれぞれを1.0mg/ml～100.0mg/ml含有する1.0容量%牛胎仔血清添加DMEMにて37℃で24時間さらに培養して、生細胞数を計測して細胞生存率を求め、50%致死濃度(LD50)を算出

した。その結果、表4に示すように、いずれの実施例においてもLD₅₀は100.0mg/mlより大きい値となっており、試験した濃度では細胞毒性は認められなかった。

【表4】

試料	LD ₅₀ (mg/ml)
実施例1	>100.0
実施例2	>100.0
実施例3	>100.0
実施例4	>100.0
実施例5	>100.0
実施例6	>100.0
実施例7	>100.0
実施例8	>100.0

【0026】以上詳述したように、本発明により、線維芽細胞等の間葉系細胞や好酸球等により産生される間質系のコラゲナーゼに対し特異的に阻害活性を示すコラゲナーゼ阻害剤を得ることができた。本発明に係るコラゲナーゼ阻害剤は、炎症や創傷、がんの転移、潰瘍形成、皮膚の老化等、コラゲナーゼの関与する病態の改善、或いは防止に有用である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

A61K 35/78

識別記号

A DU

A G Z

F I

A61K 35/78

A DU W

A G Z